

Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. E. Künzel

Abteilung für Veterinär-Histologie und Embryologie

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER SUBMUKÖSEN

ÖSOPHAGUSDRÜSEN DES HUNDES

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN

an der

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

—

vorgelegt von

Bernd WAGNER

Tierarzt aus Fürstenwalde/Spree

Berlin 1968

Journal Nr.: 614

Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. E. Künzel

Abteilung für Veterinär-Histologie und Embryologie

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER SUBMUKÖSEN

ÖSOPHAGUSDRÜSEN DES HUNDES

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN

an der

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von

Bernd WAGNER

Tierarzt aus Fürstenwalde/Spree

Berlin 1968

Journal Nr.: 614

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. G. BERGMANN

Referent: Prof. Dr. E. KÜNZEL

Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. DREPPER



Tag der Promotion: 13.2.1968

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung	4
2. Material und Methode	5-9
3. Ergebnisse und Kritik der Methode	10-18
a) Mucicarmin, Bestsches Carmin und Molybdän-Hämatoxylin	
b) PAS- und Alcianblau- Färbung	
c) Metachromasie	
d) Methode nach HALE	
e) Methylenblau- Extinktion	
f) Methylierung und Demethylierung	
g) Diastasewirkung	
h) Hyaluronidasewirkung	
i) Neuramidasewirkung	
j) Quantitative Neuraminsäurebestimmung	
4. Diskussion	19-20
5. Zusammenfassung	21
6. Literaturverzeichnis	22-24
7. Abbildungen	

Einleitung

Der histochemische Nachweis zur Differenzierung von Polysaccharidkomponenten in Schleimstoffen und Grundsubstanzen ist in den letzten Jahren durch spezifische Färbungen und biochemische Untersuchungen erweitert worden. In der Histochemie steht das morphologische, in der Biochemie das qualitative und quantitative Interesse im Vordergrund. Deshalb sind die Klassifizierungen der Histochemie und Biochemie nicht immer identisch. Dies wird besonders deutlich am Beispiel der Schleimstoffe.

Der Histochemiker kann heutzutage Nachweise erbringen, die über die anfänglichen Kenntnisse, die zu einer Einteilung in muköse und mukoide Schleime geführt haben, hinausgehen. Es bedarf deshalb ergänzender Untersuchungen der Schleimdrüsen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Ösophagusdrüsen des Hundes, die auf die Anwesenheit von neutralen und sauren Mucopolysacchariden geprüft wurden. Die Untersuchungen erfolgten unter Berücksichtigung von Altersveränderungen.

M a t e r i a l u n d M e t h o d e

Die Glandulae oesophageae bilden beim Hund (Abb.1) ein geschlossenes submuköses Drüsenlager, das vom Pharynx bis zum Magen reicht und seine mächtigste Ausdehnung im Ringwulst (Plica anularis) erreicht. Die tubulo - alveolären Drüsen besitzen den Halbmonden ähnliche Gebilde und Sekretkapillaren. Die Glandulae oesophageae reichen noch eine kleine Strecke in die Magenschleimhaut hinein. Sie liegen hier unter den Magendrüsen und ihre Ausführungsgänge münden in den Ösophagus, ausnahmsweise aber auch in die Magendrüsen. Das Epithel der Gänge ist zuerst einschichtig und wird zur Mündung hin mehrschichtig. Die Ausführungsgänge verlaufen geschlängelt und besitzen ampullenartige Erweiterungen (ELLENBERGER, 1911).

Von neugeborenen, 2-3, 5-8 und 12-14 Jahre alten männlichen und weiblichen Hunden wurden die Präparate cranial vom Limen pharyngoesophagicum und caudal vom Hiatus oesophagicus diaphragmatis gewonnen. Die Entnahme erfolgte an frisch getöteten Tieren. Das Material wurde für 12-24 Stunden in 10 %igem Calciumacetat-Formalin fixiert (LILLIE, 1954) und in Paraplast eingebettet. Für alle Untersuchungen betrug die Schnittdicke etwa 5 μ :

Für die orientierende Untersuchung wurden Färbungen mit Mucicarmin, Bestschem Carmin und Molybdän - Hämatoxylin durchgeführt. Zur weiteren Differenzierung der Mucopolysaccharide dienten die Perjodsäure - Schiff - Reaktion (PAS - Reaktion), die Färbungen mit Alcianblau, Azur A und Toluidinblau, die Methode nach HALE und die Methylenblau - Extinktion. Als Kombinationsverfahren wurden die PAS - Alcianblau - Färbung und die HALE - PAS - Färbung benutzt. Weiterhin erstreckten

sich die Untersuchungen auf die Methylierung und Demethylierung der Schnitte.

1. Mucicarmin, Bestsches Carmin und Molybdän - Hämatoxylin:

Die Schleimfärbungen mit Mucicarmin und Bestschem Carmin wurden 10 Minuten, mit Molybdän - Hämatoxylin nach Held 24 Stunden angewendet (Romeis, 1948).

2. PAS - Reaktion:

Die PAS - Reaktion wurde in Anlehnung an BARKA und ANDERSON (1963) durchgeführt. Das Schiffsche Reagenz wurde mit basischem Fuchsin nach SPANNHOF (1964) hergestellt und für das Schwefeldioxyd-medium eine 10 %ige NaHSO_3 - Lösung verwendet.

3. PAS - Alcianblau - Färbung:

Die Alcianblau - Färbung (Alcian Blue 865) nach BARKA und ANDERSON wurde mit der PAS - Reaktion kombiniert.

4. Azur A und Toluidinblau:

Für den Nachweis der Metachromasie wurde 0,02 %iges Azur A (0,7 mM) für 30 Minuten in 0,1 M Phosphat-Citrat Puffer bei einem pH von 1,5, 3,0 und 4,5 nach LILLIE (1954) benutzt, sowie 0,1 %iges Toluidinblau (Toluidine Blue O) nach der Anweisung von BARKA und ANDERSON. Die Eindeckung der Schnitte erfolgte in Karion F flüssig (CLEMENS, 1953).

5. Methode nach HALE:

Die Methode nach HALE mit kolloidalem Eisen wurde ebenfalls nach den Angaben von BARKA und ANDERSON angewendet. Sie wurde mit der PAS - Reaktion kombiniert.

6. Methylenblau - Extinktion:

Für die Methylenblau - Extinktion betrug die Inkubationsdauer der Schnitte 24 Stunden bei 20° C.

Hierzu wurde eine mit 0,64 %iger Methylenblau - Lösung (Methylene Blue B extra) versetzte Veronal-Acetat Pufferreihe verwendet. Der Bereich der pH - Werte erstreckte sich in Stufen von etwa 0,5 vom pH 1,5 bis 7,5 (KISZELY - POSALAKY, 1964). Die Eindeckung erfolgte mit Karion F flüssig.

7. Methylierung und Demethylierung:

Die Methylierung der Schnitte wurde mit 0,1 N HCl in Methanol bei 37° C und 60° C für 4 Stunden durchgeführt. Bei 25° C folgte in einer 1 %igen KOH - Lösung in 70 %igem Äthanol und 30 Minuten Dauer die Demethylierung der celloidinisierten Schnitte (LILLIE, 1958). Für die Beurteilung der Reaktion dienten die Alcianblau - Färbung und das Verhalten der Metachromasie mit Azur A bei einem pH von 2,0 und 3,0 (SPICER, 1960).

Für den enzymatischen Abbau der Polysaccharide wurden Diastase, Hyaluronidase und Neuraminidase benutzt.

1. Diastase:

Für den enzymatischen Abbau des Glykogens wurde Malzdiastase nach den Arbeitsvorschriften von BARKA und ANDERSON verwendet. Die Kontrollschnitte stammten aus der Leber des Hundes.

2. Hyaluronidase:

Die Hyaluronidase (500 IE/mg, aus Schafhoden) wurde in einer Menge von 1 mg/ml bei 37° C und einem pH von 6,0 für 4 Stunden angewendet (0,1 M Phosphatpuffer). Die Hyaluronidasewirkung wurde am metachromatischen Verhalten des Gewebes mit Azur A beurteilt. Das Vergleichsmaterial waren Schnitte aus dem Processus xiphoideus des Hundes.

3. Neuraminidase:

Die Einwirkungszeit der aus *Vibrio cholerae* hergestellten Neuraminidase (Sialidase) in 0,05 M

Acetatpuffer bei einem pH von 5,5 betrug 10 Stunden bei 37° C. Zur Beurteilung wurden die Metachromasie mit Azur A bei einem pH von 3,0 und die kombinierte Alcianblau - PAS - Färbung herangezogen (SPICER und WARREN, 1960). Die submukösen Drüsen in der Trachea der Maus dienten als Vergleichsmaterial für die Wirkung des Enzyms.

Die quantitative Neuraminsäurebestimmung erfolgte mit der Thiobarbitursäuremethode (WARREN, 1959) Das erforderliche Drüsengewebe wurde unter der Stereolupe aus dem Ringwulst des Ösophagus herauspräpariert und eine Menge von etwa 30-50 mg (Naßgewicht) jeweils homogenisiert.

1. Analytisch genaue Einwaage des Gewebes.
2. Erhitzung des homogenisierten Gewebes in 0,4 ml 0,1 N H_2SO_4 bei 80° für 1 Stunde.
3. Zugabe von 0,1 ml einer 0,2 M meta-Natriumperjodat - Lösung in 9 M H_3PO_4 zu je 0,2 ml.
Schütteln der Tuben. Bei Raumtemperatur 20 Minuten stehen lassen.
4. Zugabe von 1 ml 10%igem Natriumarsenit in einer 0,5 M Na_2SO_4 - und 0,1 N H_2SO_4 - Lösung. Schütteln der Tuben bis die gelbbraune Farbe verschwindet.
5. Zugabe von 3 ml einer 0,6%igen Thiobarbitursäure-Lösung in 0,5 M Na_2SO_4 . Erhitzen der Tuben in siedendem Wasser für 15 Minuten. Anschließend kaltes Wasserbad für 5 Minuten.
6. Zugabe von 4,3 ml Cyclohexanon. Schütteln der Tuben und zentrifugieren bei 3000 U/min für 3 Minuten.
7. Extinktionsbestimmung der roten Cyclohexanonphase im Photometer Eppendorf bei 546 nm. Leerwert Cyclohexanon. 1 cm Küvette.

Das Absorptionsmaximum der Neuraminsäure liegt bei 549 nm. Der Gehalt der Lösungsmenge an μ Mol N - Acetylneuraminsäure wird nach folgender Formel berechnet:

$\mu\text{Mol N - Acetylneuraminsäure}$

in der Einwaage

$$= \frac{V \times \text{O.D.}_{546} \times 2}{57}$$

V = Volumen der untersuchten Lösung (4,3 ml)

O.D._{546} = Extinktionsmessung bei 546 nm im
Photometer Eppendorf

57 = Molarer Extinktionskoeffizient

2 = Verdopplungsfaktor für Umrechnung auf Gesamt-
einwaage (die Reaktion wird jeweils mit dem
halben Volumen des Hydrolysenansatzes durch-
geführt, vgl. 2)

**Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen an den
Ösophagusdrüsen des Hundes:**

Methode	Ergebnis
Mucicarmin	positiv
Bestsches Carmin	negativ oder schwach pos.
Molybdän-Hämatoxylin	negativ metachromatisch
PAS - Färbung	positiv
PAS-Alcianblau-Färbung	beide positiv
Azur A pH 2,5	positiv
Azur A pH 3,5	positiv
Azur A pH 4,5	positiv
Toluidinblau pH 2,4 - 2,6	positiv
Färbung nach HALE	positiv
HALE - PAS - Färbung	beide positiv
Methylenblau-Extinktion	pos. bis pH 1,5
Diastase	negativ
Hyaluronidase	negativ
Neuraminidase	negativ
Neuraminsäurebestimmung	positiv

Ergebnisse und Kritik der Methode

1. Mucicarmin, Bestsches Carmin und Molybdän-Hämatoxylin:

Die Ösophagusdrüsen des Hundes färbten sich stets intensiv mit Mucicarmin (Abb.2), nur schwach mit Bestschem Carmin und nicht metachromatisch mit Molybdän - Hämatoxylin. Nach SEELIGER (1937) sind sie daher in die Gruppe der mukösen Schleimdrüsen einzuordnen.

2. PAS - Färbung (Abb.3) und Alcianblau - Färbung (Abb.4):

Die PAS - Färbung ist eine der wichtigsten Methoden in der histochemischen Untersuchung der Kohlenhydrate (Mc MANUS, 1946; LILLIE, 1947; HOTCHKISS, 1948; GOMORI, 1952).

Freie Hydroxylgruppen sind eine Voraussetzung für die Perjodsäureoxydation. Die als Oxydationsmittel verwendete Perjodsäure oxydiert die 1,2 - Glykol - (CHOH-CHOH) die 1 - Hydroxy- 2 - Amino - (CHOH-CHNH₂), die 1 - Hydroxy - 2 - Alkylamino - (CHOH-CHNH - R) und die 1 - Hydroxy - 2 - Keto - (CHOH - C=O) Gruppen. Außerdem baut die Perjodsäure die Bindungen ab, die zwischen den Kohlenstoffatomen bestehen, die die Hydroxylgruppen tragen. Es besteht die Möglichkeit, die entstandenen Aldehydgruppen mit einem Aldehydreagenz (Schiffssches Reagenz) sichtbar zu machen. Die Oxydation von 1,2 - Glykol zum Aldehyd ist für die Histochemie die wichtigste Reaktion; die Perjodsäure reagiert nicht mit den 1,2 - Glykol - gruppen, wenn diese verestert (Heparin, Chondroitinsulfat) oder glykosidisch gebunden sind. Eine positive PAS - Reaktion geben außer Glykogen die

Mucopolysaccharide, die Muco - und Glykoproteine sowie die Glyko -, Sphingo - und Phospholipide. In Paraffinschnitten sind alle freien Lipide und Lipoproteinkomplexe meist in so geringer Menge vorhanden, daß ihre Reaktion nicht wahrnehmbar ist. Heute gilt es als sicher, daß die sauren Mucopolysaccharide PAS - negativ sind.

Das Alcian Blue 8 GS ist ein Mucinfarbstoff, der eine wasserlösliche Kupfer - Phthalocyanin - Verbindung des unlöslichen Monostral Fast Blue darstellt. Die Methode (MOWRY, 1956) ist nur bedingt für saure Mucopolysaccharide spezifisch: die Applikation des Farbstoffes darf nur kurze Zeit betragen, da sonst alle Gewebelemente gefärbt werden. In einer sauren Lösung (pH 2,4 - 2,6) werden wahrscheinlich spezifisch die stark sauren SO_3H - Gruppen angefärbt. Die kombinierte Alcianblau - PAS - Färbung erlaubt eine bessere Beurteilung von Blockierungsmaßnahmen als die Einzelfärbungen. Hierbei geben PAS - positive und Alcianblau - negative Stellen eine Rotfärbung, Alcianblau - positive und PAS - negative oder schwach positive Stellen eine Blaufärbung. Reagieren beide Komponenten, resultiert eine Purpurfärbung (SPICER, 1960). Ihre Anwendung ergab eine positive Alcianblau - Färbung und eine positive PAS - Färbung. Die meisten Drüsenendstücke enthielten drei Farbkomponenten. Dabei überwogen flächenmäßig die Blau - und Purpurfärbung gegenüber der Rotfärbung.

3. Metachromasie:

Bestimmte kationische Farbstoffe (Toluidinblau, Azur A) färben einzelne Gewebsstrukturen in einem von der Eigenfarbe unterschiedlichen Farbton an. Diese Erscheinung bezeichnet man in der Histologie als Metachromasie. Der exakte Mechanismus dieses Vorganges ist bis heute nicht bekannt.

BANK und BUNGENBERG DE JONG (1939) halten in

ihren Arbeiten die ionogenen negativen Gruppen am Substrat für äußerst wichtig. Eine Anschauung, die sich heute allgemein durchgesetzt hat. Für das Auftreten der Metachromasie ist eine minimale Ladungsdichte am Substrat erforderlich. Polysaccharide, die die negativen Gruppen in einem Abstand von 4-6 Å tragen, weisen bereits eine mäßig stabile Metachromasie auf. Bei einem Abstand unter 4 Å resultiert eine starke und stabile Metachromasie. Der primäre Faktor ist eine Elektroadsorption. Der zweite Faktor, der noch umstritten ist, ist die Aggregation des Farbstoffes durch van der Waalsche Kräfte. Alkohole können diese Aggregationskräfte aufheben, was unter praktischen Bedingungen an geringer Alkoholresistenz der Metachromasie einzelner Gewebe beobachtet werden kann. Carboxyl -, Phosphat - und Sulfatgruppen kommen als häufigste negative Gruppen in sauren Mucopolysacchariden vor. Die Intensität der Metachromasie hängt vom Dissoziationsgrad der einzelnen sauren Gruppen ab. Die Dissoziation wiederum ist abhängig vom pH - Wert der Lösung. Deshalb dient die Metachromasie bei unterschiedlichem pH - Wert als Maßstab für die Stärke der dissoziablen Gruppen. Nach Einführung negativer Radikale (z.B. Sulfatgruppen) können auch orthochromatische Kohlenhydrate Metachromasie annehmen.

Die γ - Metachromasie (rote Anfärbung des Gewebes mit einem blauen Farbstoff) wird auf Sulfatester und andere stark saure Radikale zurückgeführt. Die β - Metachromasie (rotviolette Anfärbung) deutet auf das Vorhandensein von schwächer sauren Radikalen wie Phosphat - und Carboxylgruppen hin.

Die untersuchten Ösophagusdrüsen färbten sich mit Azur A bei einem pH - Wert von 2,5, 3,5, 4,5 und mit Toluidinblau bei einem pH - Wert von 2,7 γ - metachromatisch an. Die Intensität der Anfärbung nahm mit steigendem pH - Wert deutlich ab. In beiden

Fällen war die Metachromasie gegen Alkohol nicht resistent.

4. Methode nach HALE:

Die Methode nach HALE zum Nachweis der sauren Mucopolysaccharide wird allein nicht als spezifisch angesehen. Bei diesem Verfahren werden die Schnitte mit einer sauren Lösung von kolloidalem Eisen behandelt. Das kolloidale Eisen wird von den sauren Gruppen adsorptiv gebunden. Mit der Berliner - Blau - Reaktion kann das so gebundene Eisen nachgewiesen werden.

Bei der kombinierten HALE - PAS - Färbung (Abb.5) lieferten die Ösophagusdrüsen ein positives Ergebnis. Die Drüsenendstücke enthielten größtenteils blau und rot angefärbte Stellen nebeneinander, die sich oft überdeckten und einen violetten Farbton ergaben.

5. Methylenblau - Extinktion:

Bei der Methylenblau - Extinktion wird die Basophilie der einzelnen Substanzen im Gewebe mit steigendem pH unterschiedlich aufgehoben (DEMPSEY und SINGER, 1946). Die Basophilie der Substanzen, die sich an der Anfärbbarkeit mit Methylenblau zeigt, ist eine Funktion des isoelektrischen Punktes. In einer im Vergleich zu ihrem isoelektrischen Punkt sauren Lösung verhalten sich die Proteine als Kationen und in einer alkalischen Lösung als Anionen. Da die sauren und basischen Farbstoffe in einer Lösung ebenfalls in negativ und positiv geladene Ionen dissoziieren, können sie mit den Proteinen Salze bilden. Kationische Farbstoffe (Methylenblau) werden deshalb von sauren Mucopolysacchariden, die einen starken Dissoziationsgrad haben, noch bei einem pH - Wert von 2 gebunden. Die Anfärbbarkeit der neutralen Mucopolysaccharide verschwindet bereits bei einem pH - Wert von 3. Es hat sich bewährt, den Grad der Basophilie und nicht den isoelektrischen Punkt einer Substanz zu bewerten,

da auch bei den neutralen Mucopolysacchariden der isoelektrische Punkt unterhalb des pH - Wertes 7 liegt und somit im chemischen Sinne die Bezeichnung neutral nicht gerechtfertigt erscheint.

Die angewendete Technik ergab in den Drüsenendstücken des Ösophagus eine Anfärbung bis zu einem pH - Wert von 1,5. Bei einem pH - Wert von 1,5 und 2 färbte sich der apikale Teil einzelner Drüsenzellen schwach metachromatisch. Diese Tatsache spricht für die Anwesenheit stark saurer Gruppen. Oberhalb des pH - Wertes 6,1 färbte sich das gesamte Gewebe an.

6. Methylierung und Demethylierung:

Eine milde Methylierung (LILLIE, 1958) hemmt die Carboxylgruppen der sauren Mucopolysaccharide relativ spezifisch. Die Metachromasie und Basophilie des Gewebes werden schwächer oder verschwinden ganz. Dafür ist auch zum Teil eine Blockierung der Sulfat - und Phosphatgruppen verantwortlich. Die Methylgruppen lassen sich in der Regel reversibel hydrolysieren.

Nach der milden Methylierung konnte ein positiver Ausfall der PAS - Reaktion und eine schwache Alcianblau - Färbung an den Ösophagusdrüsen beobachtet werden. Die Alcianblau - Färbung wurde nach der Methylierung bei 60° C negativ, während die positive PAS - Reaktion erhalten blieb. Die Metachromasie war in beiden Fällen der Veresterung bei einem pH - Wert von 2 und 3 negativ. Die anschließende Hydrolyse der bei 37° C methylierten Schnitte reaktivierte die Alcianblau - Färbung, jedoch blieb die Reaktivierung der bei 60° C behandelten Schnitte aus. Das metachromatische Verhalten bei einem pH - Wert von 2 und 3 blieb negativ.

7. Diastasewirkung:

Glykogen ist ein hochmolekulares Kohlenhydrat, das sich aus α - D - Glucose in 1,4 - und 1,6 - Stellung

verbundenen Molekülen zusammensetzt. Die Kette der 1,4 - glykosidischen Bindungen wird vom Enzym Phosphorylase aufgebaut, während die Amylo - 1,6 - Glucosidase für die 1,6 - Bindungen verantwortlich ist. Beide Bindungen lassen sich durch Amylasen spalten. Die Malzdiastase enthält eine α - Amylase, die eine Endopeptidase darstellt und in der Mitte des Makromoleküls spaltet (KARLSON, 1966). Wegen der leichten Löslichkeit des Glykogens in den Fixierungsmitteln ist sein Nachweis im Gewebe äußerst problematisch.

Die Anwendung der PAS - Färbung nach dem Herauslösen des Glykogens mit Speichel - oder Malzdiastase aus dem Gewebe gilt als Kontrolle dafür, ob neben dem Glykogen noch andere PAS - positive Substanzen vorhanden sind. Nach Diastaseinkubation blieb die volle Intensität der PAS - Färbung in den Ösophagusdrüsen erhalten. An den Kontrollschnitten aus der Leber nahm die Anfärbbarkeit mit Schiffsschem Reagenz in erheblichem Maß ab und verschwand teilweise ganz.

8. Hyaluronidasewirkung:

Zu den einfachen sauren Mucopolysacchariden gehört die Hyaluronsäure, die sich aus den Disaccharideinheiten N - Acetyl - D - Glucosamin und D - Glucuronsäure mit der glykosidischen 1,3 - Bindung aufbaut (KARLSON, 1966). Sie findet sich besonders in der Grundsubstanz des Bindegewebes, in der Whartonschen Sulze der Nabelschnur, in der Synovialflüssigkeit und im Kammerwasser. Die Metachromasie der Hyaluronsäure ist umstritten und für den Nachweis nur von geringerem Wert. Das Verschwinden der Metachromasie nach Hyaluronidaseeinwirkung kann aber als Hinweis auf das Vorhandensein von Hyaluronsäure gewertet werden.

Hodenhyaluronidase spaltet Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A und C. Ein Verschwinden der

Metachromasie an den Ösophagusdrüsen nach Hyaluronidaseeinwirkung konnte nicht festgestellt werden. Als Kontrolle wurden Schnitte vom Processus xiphoideus des Hundes verwendet, an ihnen verschwand die Metachromasie.

9. Neuraminidasewirkung:

Die Neuraminsäure ist ein Aminozyucker, der in letzter Zeit wegen seines Vorkommens in Schleimsubstanzen Interesse gefunden hat (SPICER und WARREN, 1960). Die Säure kommt als N - Acetyl -, N - Glykoly - und N,O - Diacetyl - Neuraminsäure in membranbildenden Glykolipiden, Glykoproteinen und Blutgruppensubstanzen vor.

Die α - Neuraminidase (Sialidase) ist ein Enzym, das Neuraminsäure spezifisch freisetzt. SPICER und WARREN wendeten das Enzym an histologischen Schnitten an. Die Enzymwirkung wurde am Verschwinden der Metachromasie und Basophilie getestet. An den Ösophagusdrüsen blieb nach Neuraminidaseinkubation die Metachromasie und Basophilie bestehen. Als Kontrollschnitte wurden die submukösen Drüsen im Larynx der Maus verwendet. Bei ihnen verschwand entsprechend den Befunden von SPICER und WARREN die Metachromasie, und die Alcianblaufärbung wurde negativ.

10. Quantitative Neuraminsäurebestimmung:

Zur quantitativen Bestimmung der Neuraminsäure wurde die Thiobarbitursäure - Methode nach WARREN (1959) verwendet. Bei dieser Methode wird angenommen, daß die Neuraminsäuren β - Formylpyruvat nach Perjodatoxydation bilden. Der pyranoide Halbacetalring der N - Acetylneuraminsäure ist für diesen Reaktionsmechanismus bedeutungsvoll, jedoch ist seine genaue Bedeutung unbekannt. Als störende Substanz bei diesem Nachweis kommt die 2 - Desoxyribose in Frage, die ihr Absorptionsmaximum bei 532 nm hat. Im Gegensatz zur

2 - Desoxyribose wird jedoch bei Zugabe einer Base der rote Farbstoff der Cyclohexanonphase bei N - Acetylneuraminsäure zerstört.

Folgende Werte wurden für die Neuraminsäure in $\mu\text{Mol}/100 \text{ g}$ Drüsensubstanz ermittelt:

327	μMol
302	"
298	"
284	"
496	"
310	"
290	"

D i s k u s s i o n

Nach den Ergebnissen der herkömmlichen Schleimfärbungen können die submukösen Drüsen im Ösophagus des Hundes als mukös bezeichnet werden.

Der positive Ausfall der PAS - Reaktion an den Ösophagusdrüsen spricht für die Anwesenheit von neutralen Mucopolysacchariden. Mit der Diastaseprobe konnte nachgewiesen werden, daß Glykogen für diese Reaktion nicht verantwortlich sein kann. Eine Aussage über das Vorkommen von Glykogen in vivo ist nicht möglich. Andere PAS - positive Substanzen sind in den Schleimdrüsen des Ösophagus nicht auszuschließen. Da diese Stoffe jedoch in Paraffinschnitten in sehr geringer Menge vorhanden sind, können sie allein die starke positive Reaktion nicht hervorrufen.

Die positiven Resultate der Alcianblau - Färbung, der Metachromasie, der Methode nach HALE, der Methylenblau - Extinktion, der Methylierung und Demethylierung rechtfertigen den Schluß, daß die Schleimdrüsen außerdem stark saure Mucopolysaccharide enthalten. Als wichtiger Bestandteil konnte die in letzter Zeit häufig in Schleimdrüsen gefundene Neuraminsäure quantitativ bestimmt werden. Die Thiobarbitursäure - Methode gilt als relativ spezifisch für den Nachweis der Neuraminsäure.

Der Grund für das Bestehenbleiben der Metachromasie und Alcianblau - Färbung nach Neuraminidaseeinwirkung bei positivem Ausfall der Thiobarbitursäure - Methode kann nur vermutet werden. Wahrscheinlich sind dafür andere stark saure Gruppen in den Schleimdrüsen verantwortlich zu machen. Diese Annahme wird durch eine γ - Metachromasie, die allgemein auf Sulfatgruppen zurückgeführt wird, unterstützt. Die γ - Metachromasie weist keine Alkoholresistenz auf. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist aus den vorliegenden Ergebnissen

nicht möglich. Die Anwesenheit von anderen stark sauren Gruppen (Phosphat - und Sulfatgruppen) kann außerdem durch die starke Basophilie der Schleimdrüsen bis zu einem pH-Wert von 1,5 nachgewiesen werden.

Der Reaktionsmechanismus für die fehlende Reaktivierung der Metachromasie und Alcianblau - Färbung nach der Demethylierung ist nicht bekannt.

Eine Aussage über die Anwesenheit der Hyaluronsäure ist aus den vorliegenden Untersuchungen nicht möglich.

Foeten, deren Ösophagusdrüsen noch keine Schleimproduktion aufwiesen, wurden nicht untersucht. Die Ösophagusdrüsen der Neugeborenen reagierten bereits auf die Nachweismethoden für neutrale und saure Mucopolysaccharide positiv. In diesem Zusammenhang sei auf das Verhalten der Duodenaldrüsen beim Goldhamster hingewiesen (MANN, SASSE und GRAUMANN, 1966).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Ösophagusdrüsen des Hundes sind muköse Schleimdrüsen. Sie enthalten neutrale und stark saure Mucopolysaccharide. Als Bestandteil der sauren Mucopolysaccharide konnte Neuraminsäure quantitativ bestimmt werden. Ein enzymatischer Nachweis der Neuraminsäure gelang nicht. Die Ösophagusdrüsen enthalten kein Glykogen. Das Ergebnis der Hyaluronidasewirkung ist für eine Aussage über die Anwesenheit der Hyaluronsäure nicht ausreichend.

Die Ösophagusdrüsen der Hunde in den angegebenen Altersstufen wiesen keine unterschiedlichen Ergebnisse auf.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BANK, O. und H.G. BUNGENBERG DE JONG:
Untersuchungen über Metachromasie.
Protoplasma 32, 489, 1939
2. BARKA, T. and P.J. ANDERSON:
Histochemistry: Theory, practice and
bibliography.
Hoeber Medical Division, New York 1963
3. CLEMENS, H.J.:
KARION "Merk" - ein wasserlösliches Ein-
schlußmittel in der histologischen Technik.
Zschr.wiss.Mikrosk. 61, 364, 1953
4. DEMPSEY, E.W. and M. SINGER:
Observations on the chemical cytology of
the thyroid gland at different functional
stages.
Endocrinology 38, 270, 1946
5. ELLENBERGER, W.:
Handbuch der vergleichenden mikroskopischen
Anatomie der Haustiere. Bd. III
Verlag Paul Parey, Berlin 1911
6. GOMORI, G.:
The periodic acid-Schiff stain.
Amer.J.Clin.Path. 22, 277, 1952
7. HALE, C.W.:
Histochemical demonstration of acid
polysaccharides in animal tissues.
Nature, 157, 802, 1946

8. HOTCHKISS, R.D.:

A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations.

Arch.Biochem. 16, 131, 1948

9. KARLSON, P.:

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner u. Naturwissenschaftler.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966

10. KISZELY, G. - Z. POSALAKY:

Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden.

Akademiai Kiado, Budapest 1964

11. LILLIE, R.D.:

Reticulum staining with Schiff reagent after oxidation by acidified sodium periodate.

J.Laborat.Clin.Med. 32, 910, 1947

12. LILLIE, R.D.:

Histopathologic technic and practical histochemistry.

Blakiston Co.Inc., New York 1954

13. LILLIE, R.D.:

The Nile blue reaction of peptic gland zymogen granules: The effect of methylation and alkali demethylation.

J.Histochem.Cytochem. 6, 130, 1958

14. MANN, H., D. SASSE und W. GRAUMANN:

Beiträge zur Funktionsentwicklung: Duodenaldrüsen beim Goldhamster.

Acta histochem. 28, 89, 1967

15. Mc MANUS, J.F.A.:

Histological demonstration of mucin
after periodic acid.

Nature, 158, 202, 1946

16. MOWRY, R.W.:

Alcian blue technics for the histochemical
study of acidic carbohydrates.

J.Histochem.Cytochem. 4, 407, 1956

17. ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik, 15.Aufl.

R. Oldenbourg Verlag, München 1948

18. SEELIGER, M.:

Über den Bau des Gallengangsystems bei den
Carnivoren (Hund und Katze) mit besonderer
Berücksichtigung der Schleimbildung und des
Glykogengehaltes.

Zschr. Zellforsch. 26, 578, 1937

19. SPANNHOF, L.:

Einführung in die Praxis der Histochemie.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1964

20. SPICER, S.S.:

A correlative study of the histochemical
properties of rodent acid mucopolysaccharides.

J.Histochem.Cytochem. 8, 18, 1960

21. SPICER, S.S. and L. WARREN:

The histochemistry of sialic acid containing
mucoproteins.

J.Histochem.Cytochem. 8, 135, 1960

22. WARREN, L.:

The thiobarbituric acid assay of sialic acids.

J.Biol.Chem. 234, 1971, 1959

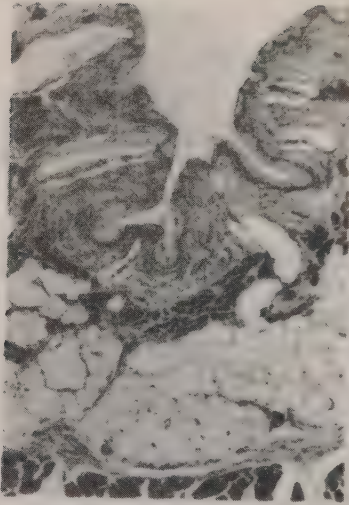


Abb.1

Ösophagus des Hundes quer
(Trichrom-Färbung, etwa
40fach vergr.)

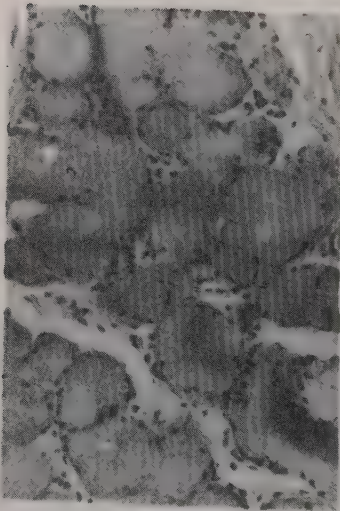


Abb.2

Ösophagus des Hundes quer
(Mucicarmin, etwa 180fach
vergr.)

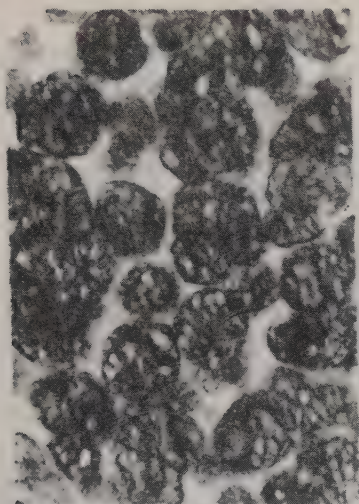


Abb.3

Ösophagus des Hundes quer
(PAS-Färbung, etwa 180fach
vergr.)

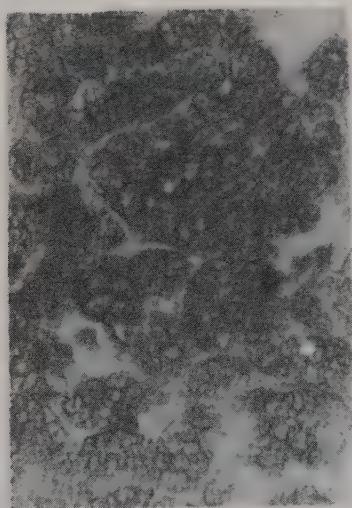


Abb.4

Ösophagus des Hundes quer
(Alcianblau-Färbung, etwa
180fach vergr.)

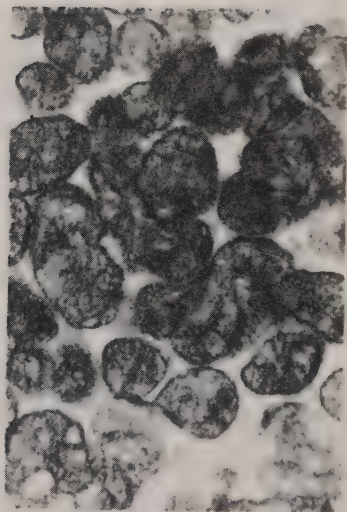


Abb.5

Ösophagus des Hundes quer
(HALE-PAS-Färbung, etwa
180fach vergr.)

L e b e n s l a u f

Am 6. Mai 1940 wurde ich, Bernd Wagner, als Sohn des Zimmermanns Georg Wagner und seiner Ehefrau Johanna, geb. Klauke, in Fürstenwalde/Spree geboren.

Vom Jahre 1946-1954 besuchte ich die Grundschule und von 1954-1958 die Oberschule in meinem Heimatort. Nach dem Abitur besuchte ich den Sonderlehrgang für Ostabiturienten an der Lessing-Schule in West-Berlin und erhielt im Juni 1959 die Anerkennung meines Ost-Reifezeugnisses.

Im Sommersemester 1960 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert und legte im Juli 1965 das vet.- med. Staatsexamen ab. Während meiner Studienzeit war ich zeitweise am veterinäranatomischen Institut der Freien Universität Berlin beschäftigt.

